

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ ТИАМИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕТГЕМОГЛОБИНА, ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И НИТРИТА

Степуро И.И., Адамчук Р.И., Коновалова Н.В.,
Пилецкая Т.П., Степуро А.И.

ГНУ «Институт биохимии НАН Беларуси», Беларусь

Нитрование тирозинильных остатков белков является биологическим маркером, свидетельствующим об усилении генерации оксида азота и образовании на его основе других активных форм азота. Первоначально считалось, что образование 3-нитротирозина является специфическим маркером на пероксинитрит, который формируется вследствие взаимодействия супероксида с оксидом азота. Более поздние исследования показали, что нитрование тирозина вызывают также нитрозильные радикалы [1]. Источником нитрозильных радикалов являются оксоферрильные формы гемоглобина в присутствии нитрита, пероксидазы в присутствии пероксида водорода и нитрита.

Пероксид водорода образуется в организме как вследствие прямой неэнзиматической реакции дисмутации супероксидов, так и вследствие реакции катализируемой СОД, а также генерируется аминоксидазой и глюкозооксидазой. Кроме того, постоянно образуют пероксид водорода макрофаги, клетки эндотелия. Переокисное окисление липидов сопровождается образованием органических пероксидов. При патологических состояниях, таких как ишемия-реперфузия, в тканях миокарда сильно возрастает концентрация нитрита и пероксидов.

Оксоферрилгемоглобин эффективно окисляет оксид азота в нитрит ($K = 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [2]), тем самым, снижая уровень оксида азота, и вероятно, может способствовать развитию дисфункции эндотелия. Нитрит в свою очередь также окисляется феррильной формой гемоглобина с образованием нитрозильных радикалов, которые вызывают нитрование тирозинильных остатков белков, что сопровождается ингибированием активности ряда ферментов или их полной инактивацией [3]. Показано, что при гипоксии феррильная форма цитохрома с генерирует нитрозильные радикалы, которые модифицируют тирозинильные остатки белков дыхательной цепи. Предполагается также, что феррилмиоглобин играет ключевую роль в тканевом повреждении при ишемии-реперфузии сердца [4].

В связи с этим перехват и детоксикация оксоферрильных форм гемопротеинов, а также нитрозильных радикалов является одной из

первоочередных задач для коррекции патологических состояний. В данной работе мы показали, что тиамин и его фосфорные эфиры разрушают оксоферрильные формы гемоглобина.

Материал и методы исследования

Метгемоглобин получали по методу описанному ранее [5]. Смесь оксоферрильных форм гемоглобина (оксоферрильная форма I или $[\text{Hb}(\text{IV}=\text{O})]$), у которой радикал локализован на белке, и оксоферрильная форма II или $[\text{Hb}(\text{IV}=\text{O})]$) получали добавляя 10-кратный молярный избыток пероксида водорода или трет-бутилпероксида к водному раствору метгемоглобина в расчете на субъединицу гемопротеина. Концентрацию оксоферрильных формы гемоглобина рассчитывали по полосе Сорэ в спектре поглощения, используя значение коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon_{420}=100\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Концентрацию тioxрома и оксодигидротиохрома определяли флуоресцентным и хроматографическим методами [6].

Результаты исследований

После добавления тиамина к оксоферрильной форме наблюдали ускорение ее восстановления до метгемоглобина (рис. 1).

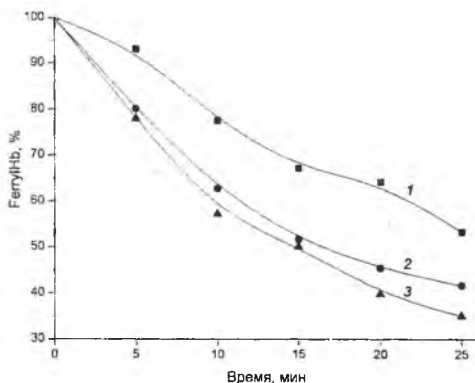


Рис. 1. Восстановление оксоферрильной формы гемоглобина (10^{-5} M) под действием различных концентраций тиамина 10^{-4} M (1), 10^{-3} M (2), $5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$ (3), в 0.05 M Na^+ -фосфатном буфере, pH 7,4, концентрация перекиси водорода (10^{-2} M).

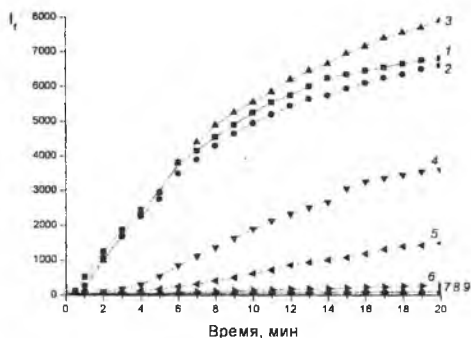
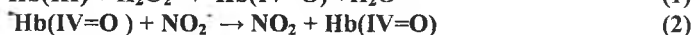
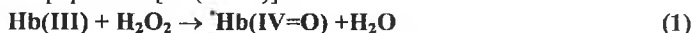


Рис. 2. Кинетика образования тioxрома и других флуоресцирующих продуктов в растворах метгемоглобина и тиаминa при различных концентрациях пероксида водорода. Концентрации: метгемоглобин 10^{-5} М (1-8), тиамин 10^{-3} М (1-7, 9), перекись водорода 10^{-3} М (1); $5 \cdot 10^{-4}$ М (2); $4 \cdot 10^{-4}$ М (3); $5 \cdot 10^{-5}$ М (4); $2 \cdot 10^{-5}$ М (5); $5 \cdot 10^{-6}$ М (6); 10^{-6} М (7); 0 (8), $5 \cdot 10^{-3}$ М (9).

При избытке тиаминa по отношению к оксоферрильной форме гемоглобина основным продуктом окисления тиаминa является тioxром. При более низких концентрациях тиаминa в растворе, содержащем оксоферрильную форму гемоглобина, наряду с тioxромом регистрируется также и оксодигидротioxром. Нитрит взаимодействует как с оксоферрильной формой гемоглобина I [Hb(IV=O)], так и оксоферрильной формой II [Hb(IV=O)].



При высоких концентрациях нитрита оксоферрильная форма гемоглобина практически полностью переходит в метгемоглобин (реакция 3), который под действием нитрозильных радикалов претерпевает модификацию как тирозинильных остатков белковой глобулы, так и функциональных групп порфиринового кольца.

Тиамин окисляется в тioxром нитрозильными радикалами, которые образуются при взаимодействии нитрита с оксоферрильной формой гемоглобина. Образовавшийся метаболит тиаминa — тioxром, является на порядок более эффективным скэвенджером нитрозильных радикалов, нежели сам тиамин.

Полученные данные позволяют заключить, что тиамин и его метаболиты разрушают токсичные оксоферрильные формы гемопротеи-

нов, ингибируют нитрование тирозина и тирозинильных остатков белков нитрозильными радикалами.

Литература

1. Ischiropoulos H. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 305, p. 776-783.
2. Herold S., Rehmann F.J. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, vol. 34, p. 531-45
3. Shishehbor M.H., Aviles R.J. *JAMA*, 2003, vol. 289, p. 1675-80
4. Galaris D., Eddy L., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 160, p. 1162-8.
5. Stepuro I.I., Chaikovskaya N.A., Vodoevich V.P., Vinogradov V.V. *Biochemistry (Mosc)*. 1997, vol. 62, p. 967-972.
6. Stepuro I.I. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, 2005, vol. 72, p. 115-127.

RADIATION-INDUCED CHANGES OF ENDOTHELIUM- AND NO-DEPENDENT REACTIVITY

Suvorava T.^{1,2}, Luksha L.¹, Lobanok L.M.^{1,2}

*Institute of Radiobiology, National Academy of Science of Belarus¹,
Belarus
Belarusian State Medical University², Belarus*

Epidemiological evidence indicate the connection between radiation exposure and cardiovascular diseases: the increase in the incidence of cardiovascular diseases among the population of contaminated with radionuclides areas and liquidators of the consequences on Chernobyl nuclear power station have been reported [1,2]. Radiation damage of living cells is, for the most part, due to oxidative stress. One of the most important biologically active molecules produced by endothelium is nitric oxide (NO). After ionizing radiation NO may play a dual role. On the one hand, NO might have antioxidant properties and can execute protective function, interacting with radiation-induced free-radicals and decreasing radiation injury. For instance, it has been demonstrated that in vitro NO is involved in radiation-induced immediate and reversible increase in vascular tone by scavenging O_2^- , and presence of superoxide dismutase (SOD) during irradiation significantly reduced the observed effects [3]. On the other hand, NO reacts very rapidly with superoxide leading to formation of much more potent oxidant peroxynitrite. Peroxynitrite and the subsequently formed radicals might act as damaging agents and have a high toxicity and mutagenic properties. Interaction of NO with radiation-induced radicals might cause a decrease in NO bioavailability, inactivation of its physiological properties and thus attenuate functional stability of irradiated organism.